

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



RECEIVED -

AUG 23 2000

C1-901PCTEAS CENTER 16002800

Concise Explanation of the Japanese Reference

Reference 1

In this application, polypeptides having 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase activity, and DNA encoding the polypeptides are claimed. Methods for producing 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase and 1alpha, 25-hydroxyvitamin D₃, and antibodies recognizing these polypeptides as well as immunohistological staining methods using the antibodies are also claimed.

The 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase gene was isolated and identified as follows:

A cDNA library was constructed kidney of rats fed on vitamin D₃-depleted meal; the cDNA of interest was amplified by PCR using primers designed based on the amino acid sequences common among other vitamin D₃ hydroxylases, such as adrenodoxin and hem binding domain sequences; the full-length cDNA was obtained using 5' RACE and plaque hybridization methods; and the sequence obtained was identified by Northern blot analysis and sequencing.

The DNA thus obtained may be used for diagnosis of the diseases associated with vitamin D₃ deficiency. The polypeptide encoded by this DNA can be expressed or synthesized, and purified using conventional methods (e.g. procaryotic and eucaryotic expression systems, chromatographic methods for purification). The DNA and polypeptides of the invention may also be used for producing antibodies used for various purposes, such as immunohistochemistry.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-75863

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月23日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 16/40		C 0 7 K 16/40	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 9/02	
9/02		C 1 2 P 33/06	
C 1 2 P 33/06		G 0 1 N 33/48	P

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-322651

(22) 出願日 平成9年(1997)11月25日

(31) 優先権主張番号 特願平9-185399

(32) 優先日 平9(1997)7月10日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72) 発明者 穴澤 秀治

東京都練馬区南大泉4-19-18

(72) 発明者 嶋田 弘子

東京都新宿区早稲田鶴巻町539

(72) 発明者 杉本 整治

東京都八王子市別所2-21-8-306

(72) 発明者 須田 立雄

東京都立川市若葉町1-8-5

(72) 発明者 新木 敏正

東京都大田区東雪谷5-11-7-310

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素および該酵素をコードするDNA

(57) 【要約】

【課題】 活性型ビタミンD₃の低下により惹起される骨粗鬆症等の成人病の予防、診断、治療等に有用な、ビタミンD₃活性化の最終段階を触媒する、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードする遺伝子を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、該形質転換体を用いた25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素の製造法、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチドを用いた1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃の製造法および該ポリペプチドを認識する抗体を提供することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1および2で表わされるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド、または配列番号1および2で表わされるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸配列とは一個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のポリペプチドをコードするDNAまたは該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項3】 DNAが、配列番号3および4で表わされる塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAである、請求項2記載のDNA。

【請求項4】 請求項2または3記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

【請求項5】 請求項4記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

【請求項6】 請求項5記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素を生成蓄積させ、該培養物より該25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素を採取することを特徴とする25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素の製造法。

【請求項7】 請求項1記載のポリペプチドおよび25-ヒドロキシビタミンD₃を水性媒体中に存在させることにより、水性媒体中に1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃を生成させ、生成した1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃を該水性媒体中より採取することを特徴とする、1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃の製造法。

【請求項8】 請求項1記載のポリペプチドを認識する抗体。

【請求項9】 請求項8記載の抗体を用いる、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチドの免疫学的検出法。

【請求項10】 請求項8記載の抗体を用いる、免疫組織染色法。

【請求項11】 請求項8記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、該形質転換体を用いた25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素の製造法、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化

酵素活性を有するポリペプチドを用いた1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃の製造法および該ポリペプチドを認識する抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】 活性型ビタミンD₃は、カルシウムの代謝調節作用、細胞の分化誘導、免疫調節など多様な生理作用を持つホルモンとして知られている。活性型ビタミンD₃は、生理作用を有しないビタミンD₃が体内で代謝され変換されることにより生成されることが知られている。

【0003】 活性型ビタミンD₃の作用機構の一つとして、細胞質レセプターを介した作用機構が明らかになっている。活性型ビタミンD₃の本体は、1 α 位と25位が水酸化された、1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃であることが知られている。活性化にいたる代謝経路として、25位に水酸基が導入されて、25-ヒドロキシビタミンD₃ができた後、1 α 位が水酸化され、活性体である1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃ができることが知られている〔ビタミンD₃のすべて、尾形悦郎、須田立雄、小椋陽介編、講談社サイエンティフィク、(1993)〕。

【0004】 25位に水酸基を導入する25位水酸化酵素遺伝子は、すでにラット肝臓由来のものがクローニングされ(特開平3-2324893)ている。また、活性型ビタミンD₃の分解に関わる、ビタミンD₃-24位水酸化酵素もクローニングされ(特開平4-207196)ている。ビタミンD₃の1 α 位を水酸化する酵素としては、ヒトのCYP27が報告されているが〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 10014(1994)〕、該酵素の1 α 位を水酸化する活性は副次的な活性で、非常に弱く、本来の活性ではない、また誘導のかかる活性でもない。

【0005】 ラットやニワトリをビタミンD₃欠乏食餌で飼育すると、腎臓での25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性が誘導されることが分かっている〔Gerontology, 42(補遺1), 67-77 (1996)〕。現在まで、ビタミンD₃活性化の最終段階を触媒する、最も重要な1 α 位を水酸化する酵素ポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードする遺伝子の単離の報告は、いずれの動物種においてもない。

【0006】 1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃の製造法として、ニワトリなどの動物の腎臓のホモジェネートやミトコンドリア画分を用いる方法〔Nature, 230, 228(1971), J. Biol. Chem., 247, 7528 (1972), Biochemistry, 25, 5512 (1986)〕が知られているが、該手法においては、大量の動物の腎臓あるいは肝臓が必要であり、調製に手間がかかることより、非効率的で実用的製造法とはいえない。また、1 α 及び25位に直接水酸基を導入する活性を持つ微生物が見出されているが(特公平4-64678)、活性は微弱で、基質特異性も低

く、生成物と副生成物との分離は困難である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、活性型ビタミンD₃の低下により惹起される骨粗鬆症等の成人病の予防、診断、治療等に有用な、ビタミンD₃活性化の最終段階を触媒する、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードする遺伝子を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、該形質転換体を用いた25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素の製造法、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチドを用いた1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃の製造法および該ポリペプチドを認識する抗体に関する。

【0009】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のポリペプチドとして、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化活性を有するポリペプチドであればいずれも用いることができ、例えば、配列番号1および2で表わされるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいは配列番号1および2で表わされるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸配列とは一個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有し、かつ25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化活性を有するペプチドをあげることができる。

【0010】ポリペプチドの有するアミノ酸配列のうち一個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有し、かつ25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化活性を有するポリペプチドは、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817 (1985)、Nature, 316, 601 (1985)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology), 8章 Mutagenesis of Cloned DNA, John Wiley & Sons, Inc. (1989)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0011】本発明のDNAとして、上記本発明のポリペプチドをコードするDNAをあげることができ、例えば、配列番号1および2で表わされるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA、配列番号1、および2で代表されるアミノ酸

配列とは一個以上のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加したアミノ酸配列を有し、かつ25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA、配列番号3および4で表される塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNA、またはこれらDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAをあげることができる。

【0012】該ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとは、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロット・ハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することによって同定できるDNAをあげることができる。

【0013】ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル (Molecular Cloning, A laboratory manual)、第2版〔サンプルック (Sambrook)、フリッチ (Fritsch)、マニアチス (Maniatis) 編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年刊、以下、モレキュラー・クローニング 第2版と略す〕等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして、例えば、配列番号1および2で表わされるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0014】本発明の抗体は、上述のポリペプチドを認識する抗体をあげることができる。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。
1) ラットの腎臓由来のmRNAからのcDNAライブラリーの作製

ビタミンD₃欠乏食で飼育することにより25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性の誘導を行ったラットの組織、例えば腎臓よりmRNA（ポリ(A)・RNAと呼ぶこともある）を調製する。

【0016】mRNAを調製する方法としては、ラットの組織より全RNAを調製し、全RNAからオリゴ(dT)固定化セルロースカラム法（モレキュラー・クロー

ニング 第2版]等を用いて、ポリ(A)・RNAとして mRNAを調製する方法、ファースト・トラック・mRNA・アイソレーション・キット (Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン (Invitrogen) 社製)、クイック・プレップ・mRNA・ピュリフィケーション・キット (Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア社製)などのキットを用いてラットの組織より直接mRNAを調製する方法等をあげることができる。

【0017】全RNAを調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン・トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソックス・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、AGPC法 [実験医学, 9, 1937 (1991)]等をあげることができる。上記と同様の方法で、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性の誘導を行わなかったラットの組織より全RNAおよびmRNAを調製することができる。

【0018】該mRNAを用いて、常法によりcDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリーの作製方法として、例えば、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性誘導を行ったラットから採取した腎臓由来のmRNAより、Stratagene社製ZAP-cDNA synthesis kit、GIBCO BRL社製のcDNA Synthesis System等を用いcDNAを合成し、適切な制限酵素で切断可能な部位を有するアダプターを連結し、該制限酵素により切断したクローニングベクター λ ZAPII (Stratagene社製ZAPII cloning Kit)の該切断部位に挿入することにより、cDNAライブラリーを作製する方法等をあげることができる。

【0019】cDNAライブラリーを作成するための、クローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立増殖できるものであればいずれも用いることができる。該クローニングベクターとして、例えばファージベクター、プラスミッドベクター等をあげることができ、好適には、上記 λ ZAPIIの他、pUC18、pBluescript (Stratagene社)等をあげることができる。

【0020】宿主微生物としては、大腸菌に属する微生物であれば、いずれも用いることができ、好適には、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000等をあげることができる。

【0021】2) ビタミンD₃水酸化酵素に特徴的なアミノ酸配列の選定
ラットのビタミンD₃・25位水酸化酵素 (特開平3-232493) および24位水酸化酵素 (開平4-207196)の両酵素に共通に存在するアミノ酸配列を有する領域を検索し、該領域に存在するアミノ酸配列をビタミンD₃水酸化酵素に特徴的なアミノ酸配列として選定する。

【0022】該配列を有する領域として、例えばアドレノドキシシン結合領域 (以下、A領域と略す)、ヘム結合

領域 (以下、H領域と略す)等をあげることができる。

【0023】3) 25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAの部分断片の増幅
2)において選定した領域のアミノ酸配列に基づき、ラットのコドン进行を参考にして、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAのポリメラーゼ・チェーン・リアクション (以下、PCRと略す)による増幅に適したセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを設計、作製する。

【0024】これらプライマーとして、例えば、配列番号7、8および9に表された塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAをあげることができる。1)で取得したmRNAを用いて、逆転写酵素反応により、first strand DNAを合成する。該DNA合成は、Stratagene社製cDNA synthetic kitを用いて行うことができる。

【0025】該first strand DNAをテンプレートとして用い、上記で作製したセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを利用し、RT (リバーシ・トランスクリプション: reverse-transcription) -PCRを行い、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAの一部を含むDNA領域を増幅する。

【0026】該RT-PCR増幅断片およびBRL社製3' RACEシステムキットを用い、mRNAの3'末端ポリA構造の間のPCR増幅を行うことで、より長く、さらには3'側の非翻訳領域も含んだPCR増幅断片を得ることができる。即ち、1)で取得したmRNAおよびBRL社製3' RACEシステムキット中のOligo dT/AUAPプライマーを用いcDNAを合成し、該DNAをテンプレートとして用い、BRL社製3' RACEシステムキット中のAUAPプライマーおよび上記RT-PCR増幅断片を利用して、PCR増幅を行うことで3'側の非翻訳領域も含んだPCR増幅断片を得ることができる。

【0027】同様に5'-RACE法を用いて、5'側の領域も含んだPCR増幅断片を得ることができる。上記増幅DNA断片が25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAの部分断片であることは以下の方法により確認することができる。

【0028】上記1)において取得した、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性誘導を行ったラットおよび非誘導ラット由来のポリ(A)・RNAを各々アガロース電気泳動にかけ、泳動されたポリ(A)・RNAをアガロースからメンブレンフィルターへ常法によりトランスファーする。これらメンブレンフィルターを用い、上記増幅DNA断片をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行う。

【0029】上記増幅DNA断片が、活性誘導を行ったラット由来のポリ(A)・RNAから作製したメンブレ

ンフィルターを用いたときのみ、ハイブリダイズすることを確認することにより、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAの部分断片であることがわかる。上記増幅DNA断片を、プラスミッドに組み込み、塩基配列の解析や、発現の特異性の解析に用いることができる。

【0030】プラスミッドに組み込む方法としては、例えば、上記増幅DNA断片をアガロースよりDNA purification kit (Bio Rad社製)を用いて抽出し、pCR IIベクター (Invitrogen社製)に連結することにより、プラスミッドに組み込む方法をあげることができる。

【0031】4) 25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAを有するクローンの選択

上記増幅DNA断片を標識化し、常法によりコロニー、あるいはブランクハイブリダイゼーションを行い、cDNAライブラリーをスクリーニングする。上記増幅DNA断片の標識化は、例えば、DIGラベリングキット (ペーリンガーマンハイム社製 #1175 033) 等を用いて行うことができる。即ち、該キットを利用して、上記増幅DNA断片をテンプレートとして用い、PCRを行うことにより、DIGラベル化した増幅DNA断片を取得することができる。

【0032】ブランクハイブリダイゼーション法としては、例えば以下の方法をあげることができる。上記1)で調製したcDNAライブラリー (ファージ)を1シャーレ当たり、1から2万個のブランクが形成するように寒天培地上に塗布し、培養する。Hybond N⁺膜 (Amersham社製)をブランクが形成したシャーレに乗せ、ブランクDNAを該膜に転写する。

【0033】該転写膜を、アルカリ処理 (例えば、1.5M NaCl、0.5M NaOH溶液に浸漬する)およびSDS処理 (例えば、2xSSC、0.1% SDS溶液に浸漬する)し、洗浄後、乾燥させ、ブランクDNAが膜上に固定されたプロットング膜としてハイブリダイズに用いる。該プロットング膜を60℃のハイブリ溶液 [5xSSC、0.1% Sarkosyl、0.02% SDS、1% ハイブリ用ブロッキング試薬 (ペーリンガーマンハイム社製)]に、5時間浸漬した後、上記で調製した標識化増幅DNA断片を熱処理したものを加え、ハイブリダイズさせる。

【0034】ハイブリダイズ後、該膜を洗浄 (例えば、2xSSCおよび0.1% SDSを用い室温で5分間の洗浄を2回、0.1xSSCおよび0.1% SDSを用い60℃で15分間の洗浄を2回実施する洗浄)、ブロッキング [例えば、1xブロッキング溶液 (ペーリンガーマンハイム社製)、0.1Mマレイン酸、0.15M NaCl、pH7.5を用いたブロッキング]した後、標識化増幅DNA断片の標識に応じた方法で標識化

増幅DNAを検出することにより、目的とするクローンを選択することができる。

【0035】例えば、DIG標識化したDNA断片を用いた場合には、AP標識した抗DIG抗体との反応、アルカリ処理 (例えば、0.1M Tris-HCl (pH9.5)、0.1M NaClおよび50mM MgCl₂溶液に浸漬)を行い、DIG発光検出キット (ペーリンガーマンハイム社製 #1363 514)を用いて、プローブとハイブリダイズするブランクをX線フィルム上でスクリーニングすることにより、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAを有するクローンを選択することができる。

【0036】5) 25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAの取得

上記4)に記載のスクリーニングによって取得されたクローンより、常法によってDNAを単離することにより25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAを取得することができる。

【0037】該DNAの塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger)らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]あるいは373A・DNAシーケンサー [パーキン・エルマー (Perkin Elmer) 社製]等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより行うことができる。このようにして決定された25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子配列として、例えば配列番号3もしくは配列番号5で示された配列を有するDNAをあげることができる。

【0038】上述の方法により決定されたDNAの塩基配列に基づいて、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

【0039】更に、上記で取得したラット由来の25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子を用い、以下に示す方法により、他の動物、例えば、ヒト由来の25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子を取得することができる。上記で取得した25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAを例えばメガプライムDNAラベリングキット (Amersham社製)等を利用して α -³²P-dCTPで標識する。目的とする動物組織、例えば、ヒト腎臓等より上記1)記載の方法と同様にcDNAライブラリーを作成する。

【0040】上記4)記載の標識DNA断片をプローブとして用い、コロニー、あるいはブランクハイブリダイゼーションを行って、該cDNAライブラリーをスクリーニングする。該スクリーニングより取得されたクロー

ンより、上記5)と同様の方法で目的とするDNAを単離し、塩基配列を決定する。

【0041】該塩基配列がラット25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子の塩基配列と相同性が高いものを、目的とする動物由来の25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAとしてあげることができる。該遺伝子としては、ヒト腎臓に由来する配列番号4もしくは配列番号6に示された配列を有するDNA等をあげることができる。

【0042】6) 25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素ポリペプチドの生産
上記5)で取得した25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAを宿主細胞中で発現させるために、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1~34等に記載された方法等を用いることができる。

【0043】即ち、上記5)で取得したDNAを、制限酵素、あるいはDNA分解酵素で、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAを含む適当な長さのDNA断片とした後に、発現ベクター中のプロモーター下流に挿入し、次いで上記DNAを挿入した発現ベクターを発現ベクターに適合した宿主細胞中に導入する。

【0044】宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。発現ベクターとしては、上記宿主細胞において、自立複製可能なものは、染色体中への組み込みが可能で、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子を転写できる位置に、プロモーターを含有しているものが用いられる。

【0045】細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合には、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子発現ベクターを原核生物中で、自立複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNA、転写終結配列より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0046】発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pSE280 (Invitrogen社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 (Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984))、pLSA1 (Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989))、pGEL1 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985))、pBluescript (STRATAGENE社)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32 (FERM BP-5408)、pGHA2

(FERM BP-400)、pGKA2 (FERM B-6798)、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194等を例示することができる。

【0047】プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター (Plac)、 λ プロモーター、Prプロモーター、PletIプロモーター、Pseプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター (Ptrp x 2)、tacプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0048】リボソーム結合配列としては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、シャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミッドを用いることが好ましい。本発明の25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子の発現には、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

【0049】宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属、シュドモナス属、バチルス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichiacoli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354等をあげることができる。

【0050】組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972))、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942)、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

【0051】酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) pHS19、pHS15等を例示することができる。プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【0052】宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリュイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、トリコスポロン・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、シュワニオミセス・アルビウス (*Schwanniomyces alluvius*)等をあげることができる。

【0053】組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriol.), 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

【0054】動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133, (1990)]、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8 [ネイチャー (Nature), 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製) pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAGE210等を例示することができる。

【0055】プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のIE (immediateearly) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0056】宿主細胞としては、ナマルバ細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、COS1細胞、COS7細胞、CHO細胞等をあげることができる。動物細胞への組換えベクターの導入法としては、動物細胞にD

NAを導入できるいかなる方法も用いることができる。例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]、virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等を用いることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

【0057】昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フィリーマン・アンド・カンパニー、ニューヨーク1992年 (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York, 1992)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サブルメント38, 28, ユニット16.9, 16.11, ジョン・ウィリー・アンド・サン、ニューヨーク、1995年 (Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 38, 28, Unit 16.9, 16.11, John Wiley and Sons, New York, 1995)、Bio/Tech nology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。

【0058】即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにInvitrogen社製)等をあげることができる。

【0059】バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) などを用いることができる。昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フィリーマン・アンド・カンパニー、ニューヨーク1992年 (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York, 1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh5 (Invitrogen社製)等を用いることができる。

【0060】組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。遺伝子の発現方法としては、直接発現以外

に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合タンパク質発現等を行うことができる。

【0061】酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0062】大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

【0063】窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

【0064】無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0065】また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0066】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

【0067】培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下の条件下で1～7日間行う。また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーマンジェン (Pharmingen) 社製〕、Sf-900 II SFM培地〔ギブコBRL社製〕、ExCell 400、ExCell 405

〔いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製〕、Grace's Insect Medium〔Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

【0068】pH6～7、培養温度25～30℃がよく、培養時間は、通常1～5日間である。また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させたポリペプチドを単離精製するためには、通常酵素の単離、精製法を用いればよい。

【0069】例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0070】また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。該可溶化

液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0071】本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【0072】また、上記方法により発現させたポリペプチドを、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易(米国AdvancedChemTech社製)、パーキンエルマー・ジャパン(米国Perkin-Elmer社製)、ファルマシアバイオテック(スウェーデンPharmacia Biotech社製)、アロカ(米国Protein Technology Instrument社製)、クラボウ(米国Synthecell-Vega社製)、日本パーセプティブ・リミテッド(米国PerSeptive社製)、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

【0073】7) 1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃の製造

上記6)に記載の方法により取得した25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチドおよび25-ヒドロキシビタミンD₃を水性媒体中に存在させることにより、水性媒体中に1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃を生成させ、生成した1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃を該水性媒体中より採取することにより、1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃を製造することができる。

【0074】25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチドとしては、上記6)に記載の方法により精製したポリペプチドおよび上記6)に記載の方法により取得した形質転換体の培養物、菌体、菌体処理物等を用いることができる。菌体処理物としては、菌体の乾燥物、凍結乾燥物、界面活性剤または有機溶剤処理物、酵素処理物、超音波処理物、機械的摩砕処理物、菌体の蛋白質画分(25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有する画分)、菌体および菌体処理物の固定化物等をあげることができる。

【0075】25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチドの濃度は、微生物菌体換算で0.01~50g/l、好ましくは0.05~10g/lである。水性媒体としては、水、リン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、ならびに、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなど

のケトン類、アセトアミド等のアミド類などの有機溶媒を含有した水性溶液があげられる。また必要に応じてトリトンX-100(ナカライテスク社製)やノニオンHS204(日本油脂社製)などの界面活性剤あるいはトルエンやキシレンのような有機溶媒を0.1~20g/l程度添加してもよい。

【0076】25-ヒドロキシビタミンD₃の濃度は、0.01~50g/l、好ましくは0.01~10g/lである。水性媒体に、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチド、25-ヒドロキシビタミンD₃を上記濃度添加し、温度15~80℃、好ましくは20~40℃、pH3~11、好ましくはpH4~9の条件下で、5分間~96時間反応させ、1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃を製造することができる。

【0077】8) 25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素を認識する抗体の調製
上記6)に記載の方法により取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品(抗原)を50~100 μ g/匹程、ウサギ、ヤギまたは3~20週令のラット、マウスもしくはハムスターの皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバント〔例えば、フロインドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど〕とともに投与する。該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法):医学書院刊1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988〕などで確認する。

【0078】免疫に用いた抗原に対し、該血清が充分な抗体価を示したウサギ、ヤギ、マウス、ラットまたはハムスターより血清を取得し、該血清より、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析法、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテインA-カラムあるいはグルー過カラム等を用いたクロマト法等の常法を用いて精製抗体を取得することができる。

【0079】また、上記方法により免疫した動物の脾細胞とマウスのミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、このハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を採取することにより本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を製造することができる。

【0080】9) 本発明のポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNAまたは本発明のポリペプチドを認識する抗体の利用

(1) 本発明のポリペプチドは、活性型ビタミンD₃である1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃を製造するために利用することができる。

(2) 本発明のポリペプチドの全長、あるいは部分断片

は、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素を認識する抗体の抗原として利用することができる。

【0081】(3) 本発明の25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素の全長または活性を持つ部分断片を生体に投与することにより、該酵素タンパクの低下が原因となる疾病、例えば骨粗鬆症の治療が可能となる。

(4) 本発明のDNAを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法(モレキュラー・クローニング 第2版)、PCR法[PCRプロトコルズ(PCR Protocols)、アカデミック・プレス(Academic Press)(1990)]、RT-PCR法等により、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子のmRNAを検出することができる。

【0082】該検出法を利用し、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子のmRNAの発現量を測定する診断法は、活性型ビタミンD₃量の低減により起こる骨粗鬆症等の成人病の発症を抑制するうえで有用であり、該25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子の先天的な欠損による遺伝子病の早期診断に有効である。

【0083】mRNAの発現量は、ノーザン・ハイブリダイゼーション法の場合は、ハイブリダイズしたプローブの量をプローブの標識に応じて、例えば³²P標識の場合は放射エネルギー、蛍光標識の場合は蛍光量を測定することにより測定できる。RT-PCR法の場合は、例えば増幅断片をエチジウムブロミドやサイバークリーン1などのDNA特異的な蛍光染色剤で染色し、その蛍光量を測定することにより測定できる。

【0084】(5) 本発明のDNAをレトロウイルス、アデノウイルス等のウイルスベクターや、その他のベクターに組み込み、遺伝子治療の方法により、治療に用いることができる。

(6) 本発明の抗25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素抗体を用いることにより、血液、臓器の一部、細胞等のサンプルで、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素の検出、定量を行うことが出来る。具体的に好適な手法としてはマイクロタイタプレートを用いるELISA法・蛍光抗体法、ウェスタンブロット法などが上げられ、また病理切片を用いた免疫組織染色にも利用出来る。従って、該抗体はビタミンD₃-1 α -水酸化酵素発現の低下に伴う骨粗鬆症等の疾病やその発症の診断や発症の可能性を早期に予知すること等に有用である。同様に、該タンパクを対象とした研究における研究用試薬としても有用である。

【0085】(7) 本発明の抗体を用いて、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチドの免疫組織染色に利用でき、該抗体を含有する免疫組織染色剤を提供することができる。

(8) 本発明のDNAを用い、ゲノムDNAとのハイブ

リダイゼーションによって、本遺伝子のプロモーター領域のDNAをクローニングすることができる。そのプロモーター領域のDNA断片を用いて、本遺伝子の発現調節に関わる分子の探索、解析を行うことができる。

【0086】以下に実施例を示し、本発明の詳細を説明する。各操作でキットを使用した場合は、特に記載した以外は、添付のプロトコールに従って実験を進めた。基本的な遺伝子操作技術は、モレキュラー・クローニング 第2版に従った。

【0087】

【実施例】

実施例1 ビタミンD₃欠乏食で飼育したラットからの腎臓の調製

S.D.系ラットの雄4匹について、離乳後直ちにビタミンD₃欠乏食を与え、3週間飼育する(6週令)。ビタミンD₃欠乏食は、DIET11(須田ら;J. Nutrition, 100, 1049(1970)、Teklad社(Madison, WI, USA)よりPurified diet for Ratとして販売)を用いた。飼料中のカルシウムは0.03%、リン酸は0.6%のビタミンD₃欠乏低カルシウム飼料となっている。

【0088】ラットの水分補給にはイオン交換水を用いた。屠殺48時間前に、1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃(CALVIOCHEM社製、CA, USA)を1 μ g/ラット静脈注射した。予定の期間飼育の後、ラットをエーテル麻酔した。該ラットの腹大動脈より採血し、瀉血法で屠殺した後、直ちに解剖して、腎臓を取り出した。

【0089】該腎臓を、PBS(1L中にNaCl 8g、KCl 0.2g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.9gおよびKH₂PO₄ 0.2gを含有する)で洗浄後、液体窒素中で凍結した。対照として、通常の飼料(Rat diet: 100g中にカルシウム0.5g、リン酸0.6gおよびビタミンD₃を200IU含有する)を与えて同様に飼育したラットについても、上記と同様の方法により腎臓を調製し、活性非誘導ラット由来の腎臓として用いた。

【0090】実施例2 ラット腎臓より、mRNAの調製

ビタミンD₃欠乏食で飼育したラットより調製した腎臓0.78g、通常の飼料で飼育したラットより調製した腎臓0.94gをそれぞれPBSで洗浄後、液体窒素中で凍結した。該凍結腎臓は-80℃で保存することができる。該凍結腎臓を、ワーリングブレンダーで液体窒素中で細断し、組織が砂状になったら、液体窒素を蒸発させた。

【0091】該砂状組織を、5.5M GTC溶液(500ml中にグアニジンイソチオシアネート 324.5g、クエン酸ナトリウム 3.7gおよびザルコシル(Sarkosyl) 3.3gを含有する)35mlおよび2-メルカプトエタノール 492 μ lを加え、氷冷しながらホモジェナイザー(Digital Homogenizer井内社

製)でホモゲナイズ後、50ml容注射筒に18ゲージの注射針を装着し、ホモゲナイズした懸濁液を4回通筒する。

【0092】該懸濁液を15ml容遠心チューブに移し、6000回転、20℃の条件下で10分間遠心分離を行い、上清を取得した。該上清を16mlずつ、CsTFA調製液〔Pharmacia社製CsTFA溶液 100ml、0.25M EDTA溶液 (pH7.0) 82.06ml、H₂O 23.09mlを混合した溶液) 17mlのに入った40ml容の超遠心用ポリアロマー製のチューブに重層した後、25000回転、18℃の条件下で25時間超遠心分離を行った。

【0093】上清を除き、チューブの下から1.5cmほどの位置から切断し、沈殿を4M GTC溶液 (5.5M GTC溶液 4ml、H₂O 1.5ml、2-メルカプトエタノール 56μlを混合した溶液) 0.6mlに溶かした。該溶解液を14000回転で15秒間遠心分離し、上清を取得した。該上清に1M 酢酸ナトリウムを15μl、エタノールを0.45ml加え懸濁後、遠心分離し、沈殿を取得した。

【0094】該沈殿を70%エタノールで洗浄後、TE緩衝液〔10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA-NaOH (pH8.0)〕1mlに懸濁し、14000回転で15秒間遠心分離後、上清を取得した。該上清に2.5倍容の70%エタノールを加え、遠心分離し、沈殿を取得した。

【0095】該沈殿を70%エタノールで洗浄後、TE緩衝液500μlに溶解した。該操作により、260nmの吸光度より計算して、活性誘導ラット由来の腎臓より639μg、非誘導ラット由来の腎臓より918μgの総RNAを取得した。活性誘導ラット由来の総RNA溶液150μlを65℃で5分間熱処理し、直ちに氷冷した。

【0096】該溶液に、5M NaClを0.5mlおよびTE/NaCl〔10mM Tris-HCl (pH7.5)、NaCl 500mM〕で平衡化したオリゴdTセルロース (Collaborative research社、type 3)を0.15g加え、該セルロースに総RNAを吸着させた。該セルロースをカラムに充填し、TE/NaCl液を8ml通塔し、洗浄した後、0.5mlのTE液でmRNAを溶出し、溶出液を200μlずつ分画採取した。

【0097】該分画液より2μlずつサンプリングし、該サンプリング液に1μg/mlのエチジウムブロマイドを20μl添加後、紫外線照射により光るサンプリング液を検出した。該サンプリング液に相当する分画液にエタノールを添加し、沈殿を得た。該沈殿を80%エタノールで洗浄後、TE緩衝液に懸濁した。

【0098】上記操作により、活性誘導ラット由来の腎臓より14.3μgのmRNAを取得した。

【0099】実施例3 cDNAライブラリーの構築
Stratagene社製ZAP-cDNA synthesis kit (#200400)を用い、添付の説明書に従ってcDNAライブラリーを構築した。実施例2で調製した活性誘導ラット由来のmRNAを4μg用い、逆転写酵素反応により、first strand DNAを合成し、RNA分解酵素反応後、DNAポリメラーゼIでsecond strand DNAを合成した。

【0100】高温条件下でPfuDNAポリメラーゼ反応を行い、該cDNAの端を平滑末端化した。該cDNAにEcoRIアダプター断片を連結し、リン酸化後、XhoIで切断し、EcoRI-XhoIの切断サイトを両端に持つcDNA断片とした。該cDNA断片を、ラムダZAPIIのEcoRI-XhoI部位に挿入し、Giga pack Gold Packaging Kit (Stratagene社製)を用いたパッケージング、大腸菌宿主XL1-Blue、MRF'株とヘルパーファージVCS257を用いた、感染により、cDNAライブラリーを構築した。

【0101】実施例4 活性誘導ラットの腎臓で特異的に発現しているmRNA分子の選択

既に報告のあるラット由来ビタミンD₃・25位水酸化酵素、および24位水酸化酵素についてアミノ酸配列を解析し、これらP450ファミリーに属するビタミンD₃水酸化酵素に良く保存されている領域のうち、酵素活性に必須なアドレノドキシン結合領域 (A領域)、および、ヘム結合領域 (H領域)の部分アミノ酸配列を選択し、そのDNA配列から、その部分の遺伝子をPCR増幅するためのセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを設計した。

【0102】具体的には、センスプライマーとしてA領域に相当する配列番号7に示された塩基配列を有するDNAを、アンチセンスプライマーとしてH領域に相当する配列番号8に示された塩基配列を有するDNAを用いた。Stratagene社製ZAP-cDNA synthesis kit (#200400)および実施例2で取得した活性誘導ラット由来のmRNAを4μg用い、random hexamerをプライマーとして、first strand DNAを合成した。

【0103】該first strand DNAをテンプレートとして、配列番号7に示された塩基配列を有するDNAをセンスプライマーとして、配列番号8に示された塩基配列を有するDNAをアンチセンスプライマーとして用い、Stratagene社製RT-PCR kitを利用して、PCRを行った。PCRは、PERKIN ELMER社製のDNA Thermal Cycler480を用い、94℃で30秒間、42℃で1分間、72℃で1分間の工程を1サイクルとして、35サイクル行った。

【0104】反応物をアガロースゲル電気泳動で解析したところ、255bpの増幅断片 (AH断片)が認められた。該断片をアガロースより、DNA purification kit (Bio Rad社製)を用いて抽出しPCR IIベクター

(Invitrogen社製)に挿入した。実施例2で取得した、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性誘導を行ったラットおよび非誘導ラット由来の全RNAからポリ(A) \cdot RNAを調製し、各々アガロース電気泳動にかけ、泳動されたmRNAをアガロースからメンブレンフィルターへ常法によりトランスファーした。

【0105】これらメンブレンフィルターを用い、上記増幅AH断片をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。上記増幅AH断片は、活性誘導を行ったラット由来のmRNAから作製したメンブレンフィルターを用いたときのみ、ハイブリダイズした。該AH断片はA領域およびH領域に相応する塩基配列を有していた。

【0106】該AH断片を用い、BRL社製3'RACEシステムキットを利用して、以下の方法で25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAの3'側の非翻訳領域も含んだPCR増幅断片を得た。BRL社製3'RACEシステムキットに付属のOligodT/AUAPプライマーおよび、実施例2で取得した活性誘導を行ったラット由来のmRNAを4 μ g用い、cDNAを合成させた。

【0107】該cDNAをテンプレートとして用いた。上記で増幅されたAH断片の有する配列から、配列番号9で示された塩基配列を有するDNAを合成し、センスプライマーとして用いた。BRL社製3'RACEシステムキットに付属のAUAPプライマーをアンチセンスプライマーとして用いた。

【0108】上記テンプレート、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーを用い、PCRを、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で2分間の工程を1サイクルとし、35サイクル行った。反応物をアガロースゲル電気泳動で解析したところ、1.3kbの増幅断片(A3断片)が認められた。該断片をアガロースより、DNA purification kit (Bio Rad社製)を用いて抽出し、pCRIIベクターに挿入した。

【0109】A3断片もAH断片と同様に、活性誘導ラット由来のmRNAに特異的にハイブリダイズした。該A3断片はAH断片のほぼ全長を含んでいた。

【0110】実施例5 25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAの取得 実施例2で調製したcDNAライブラリー(ファージ)を1シャーレ当たり、1から2万個のブラークが形成するように寒天培地上に塗布し、培養した。Hybond N⁺膜(Amersham社製)をブラークが形成したシャーレに乗せ、ブラークDNAを該膜に転写した。シャーレ1枚に付いて、2枚ずつの転写膜を作成した。

【0111】該転写膜を、アルカリ処理(1.5M NaCl、0.5M NaOH溶液に浸漬)およびSDS処理(2xSSC、0.1% SDS溶液に浸漬)し、洗浄後、乾燥させ、ブラークDNAが膜上に固定された

プロットング膜として、後述のハイブリダイズに用いた。DIGラベリングキット(ペーリンガーマンハイム社製 #1175 033)および、AH断片またはA3断片各々2ngをテンプレートとして用い、PCRを行い、DIGラベル化したAH断片またはA3断片を取得した。

【0112】PCRは、94℃で1分間、50℃で1分間、72℃で1分間の工程を1サイクルとして、30サイクルの条件で行った。得られたDIGラベル化AH断片およびDIGラベル化A3断片を後述のプローブとして用いた。上記で調製したプロットング膜を60℃のハイブリ溶液[5xSSC、0.1% Sarkosyl、0.02% SDS、1% ハイブリ用ブロッキング試薬(ペーリンガーマンハイム社製)]に、5時間浸漬した後、熱処理したDIGラベルプローブ(10 μ l/10ml ハイブリ溶液)を加え、65℃で一晩ハイブリダイズした。

【0113】ハイブリダイズ後、膜の洗浄(2xSSCおよび0.1% SDSを用い室温で5分間の洗浄を2回、0.1xSSCおよび0.1% SDSを用い60℃で15分間の洗浄を2回実施)、ブロッキング[1xブロッキング溶液(ペーリンガーマンハイム社製)、0.1Mマレイン酸、0.15M NaCl、pH7.5を用いて実施)、AP標識した抗DIG抗体との反応(ペーリンガーマンハイム社プロトコルに準じて実施)、アルカリ処理[0.1M Tris-HCl(pH9.5)、0.1M NaClおよび50mM MgCl₂を用いて実施)を行い、DIG発光検出キット(ペーリンガーマンハイム社製 #1363 514)を用いて、プローブとハイブリダイズするブラークをX線フィルム上でスクリーニングした。

【0114】このとき、DIGラベルプローブとしてまずDIGラベル化AH断片を用い、該断片とハイブリダイズするブラークを選択し、次にDIGラベル化A3断片を用い、該ブラークより、該断片とハイブリダイズするブラークを選択した。各段階で選択されたブラークは、再度シャーレに撒き、ハイブリダイズすることを確認した。また、A領域、AUAPの両プライマーを用いたPCRにより、該ブラークがA3断片の塩基配列を有することを確認した。

【0115】総計35枚のシャーレを探索し、最終的に4つのブラークを(No. 221、522、411、111)選択した。各ブラーククローンからDNAを抽出し、Rapid excision kit (Stratagene社製、#211204)を用いて、pBluescriptベクターに繋ぎ換え、M13プライマーを用いクローン中に挿入されたDNAの塩基配列を解析した。

【0116】No. 221クローンによる解析により、配列番号5に示された、2469bpの塩基配列を有するDNAが認められた。該DNAには、501アミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム(以下、O

RFと略す)が認められ、P450ファミリータンパクに共通するヘム結合領域、アドレノドキシシン結合領域と思われるアミノ酸配列が存在していた。

【0117】実施例6 分離した25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子の動物細胞系での発現

実施例5で記載したNo. 221クローンより、プラスミッドを調製し、HindIIIおよびXbaIで切断した。動物細胞用発現ベクターp cDNA3 (invitrogen社製)を同様にHindIIIおよびXbaIで切断した。

【0118】上記で得られた切断断片、各々をアガロース電気泳動にかけ、各々の断片を分離抽出した。得られたベクター側DNA断片および挿入遺伝子断片をDNAライゲーションキット(宝酒造製)を用いて連結し、連結プラスミッドを取得した。該プラスミッドを用い大腸菌DH5 α 株を形質転換し、アンピシリン耐性株を選択し、公知の方法に準じてプラスミッドを抽出した。

【0119】該プラスミッドの制限酵素切断による解析から、該プラスミッドが目的の遺伝子を組み込んでいることを確認し、pCMD3Rと命名した。pCMD3Rをエレクトロポレーション法(Potterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 716(1984))により、動物細胞に導入し、以下のように発現させた。COS7細胞を10%FCS(ウシ胎児血清)を添加したDMEM培地(GibcoBRL社製)を用い、ディッシュ中で2日間培養した。

【0120】培養後、トリプシン処理によって、ディッシュから細胞を剥離させ、該細胞をPBSを用いて洗浄し、2 \sim 6.0 \times 10⁶/mlになるように細胞をKPBBS(137mM KCl, 2.7mM NaCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.5mM NaH₂PO₄, 4mM MgCl₂)0.5mlに懸濁した。該懸濁液およびpCMD3Rプラスミッド15 μ gを溝幅0.4cmのpulsercuvette(BIO-RAD社製)に加え、混合した後、エレクトロポレーション装置Gene pulser(BIO-RAD社製)を用い、960 μ F、0.22kVの条件で、パルス印加を行い、DNAを導入した。

【0121】該DNA導入細胞を10%FCSを含むDMEM培地10mlに懸濁し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で48 \sim 72時間培養した。ディッシュの培養液を除いてPBSで2回洗浄し、スクレーパーで細胞をかきとり、遠心して細胞を集めた。

【0122】実施例7 ヒト由来25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子の取得

ヒト腎ガンより摘出した組織1.2gより、実施例2に記載の方法に準じ、総RNA750 μ gを取得し、該総RNAより9.5 μ gのmRNAを取得した。該mRNA5 μ gを用いて、実施例3に記載の方法に準じ、ヒトcDNAライブラリーを構築した。

【0123】実施例5に記載の方法に準じ、ヒト由来の25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードするDNAを取得した。実施例5において分離された2469bpのラットビタミンD₃水酸化酵素遺伝子の全長を、実施例5に記載の方法でDIGラベル化したものをプローブとして用いた。

【0124】ハイブリダイゼーションは、ホルムアミドを40%含むハイブリ溶液を用い、一晚、42℃の条件で行った。該ハイブリダイゼーションにより4つのクローンを選択した。実施例5に記載の方法に準じ、これらクローンよりDNAを抽出し、クローン中に挿入されたDNAの塩基配列を解析した。

【0125】該DNAは配列番号6に示された塩基配列を有していた。該DNA断片には、508アミノ酸のペプチドがコードされているORFが認められた。該ペプチドは、ラット由来の25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素と413アミノ酸残基ほど同じ配列を有し、P450ファミリータンパクに共通する、ヘム結合領域、アドレノドキシシン結合領域と思われるアミノ酸配列を有していた。

【0126】また、該DNA配列は、ラット由来のものと1724残基同じ配列を有し、高い相同性が認められた。

【0127】実施例8 ラット由来ビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子の発現と活性測定

実施例6の方法に準じエレクトロポレーション法で、ラット由来ビタミンD₃-1 α -水酸化酵素遺伝子を含む遺伝子発現プラスミッドpCMD3RをCOS-7細胞へ導入した。該遺伝子導入細胞5 \times 10⁵を10%FCSを含むDMEM培地10ml中で24時間培養後、培地を1%FCSを含むDMEM培地8mlに交換し、[26, 27-³H]-25-ヒドロキシビタミンD₃(Amersham社製)を2000Bq/3 μ lメタノール溶液を加え、24時間培養した。

【0128】培養後、該培養上清および細胞より、Bligh&Dyerの方法(Can. J. Biochem., 37, 911(1959))でビタミンD₃代謝産物を抽出した。即ち、50ml用のスクリーキャップ付きの遠心管に該培養液を移し、残ったシャーレに10mlのメタノールを加え、スクレーパーで細胞を掻きとり該遠心管に移した。再度該シャーレにメタノール10mlを添加し、シャーレに残っていた細胞を懸濁後、該懸濁液を全て該遠心管に移した。

【0129】該遠心管にクロロホルム10mlを加えよく混合し、さらに、10mlのクロロホルムを加え、再びよく混合後、静置し、クロロホルム層と水層とに分離させた。分離されたクロロホルム層のクロロホルム抽出液を別の遠心管に取り、残った水層に再びクロロホルム10mlを加え、同様に混合抽出を行い、得られたクロロホルム抽出液を、先に取得したクロロホルム抽出液と合わせた。

【0130】該クロロホルム抽出液に、蒸留水を全容が60mlになるまで加え、飽和食塩水を2滴添加後、充分に混合した。該混合液を遠心分離し、クロロホルム層と水層とに分離させた。得られたクロロホルム層の画分を窒素ガス気流下で、濃縮し残滓を取得した。該残滓をiso-プロパノール/メタノール/n-ヘキサン=6:6:88の混合溶液400 μ lに溶解した。

【0131】JASCO社製HPLCシステム880PUを用い、TSKsilicagel150カラム(4.6 \times 250mm, tosoh社製)を装着し、iso-プロパノール/メタノール/n-ヘキサン=6:6:88の混合溶液を移動相として、流速1ml/分の条件で分析した。標準物質の流出時間との対比によって、ビタミンD₃代謝物の同定を行った。

【0132】同様に、本遺伝子を含まないベクターpcDNA3を用いてビタミンD₃代謝物の同定を行った。結果を図1に示した。AがpcMD3Rを導入した細胞による代謝産物、BがpcDNA3を導入した細胞による代謝産物の分析結果である。本発明の遺伝子を含むpcMD3Rを導入した細胞のみ、1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃が検出されたことより、この細胞のみが25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を持つことが示され、本発明の遺伝子が25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素をコードしている

ことが分かった。

【0133】

【発明の効果】本発明により、活性型ビタミンD₃の低下により惹起される骨粗鬆症等の成人病の予防、診断、治療等に有用な、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、該形質転換体を用いた25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素の製造法、25-ヒドロキシビタミンD₃-1 α -水酸化酵素活性を有するポリペプチドを用いた1 α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃の製造法および該ポリペプチドを認識する抗体を提供することができる。

【0134】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 501

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

起源:

生物名: ラット

組織の種類: 腎臓

配列

Met	Thr	Gln	Ala	Val	Lys	Leu	Ala	Ser	Arg	Val	Phe	His	Arg	Val	Gln
1					5				10					15	
Leu	Pro	Ser	Gln	Leu	Gly	Ser	Asp	Ser	Val	Leu	Arg	Ser	Leu	Ser	Asp
			20					25					30		
Ile	Pro	Gly	Pro	Ser	Thr	Pro	Ser	Phe	Leu	Ala	Glu	Leu	Phe	Cys	Lys
			35				40					45			
Gly	Gly	Leu	Ser	Arg	Leu	His	Glu	Leu	Gln	Val	His	Gly	Ala	Ala	Arg
		50			55				60						
Tyr	Gly	Pro	Ile	Trp	Ser	Gly	Ser	Phe	Gly	Thr	Leu	Arg	Thr	Val	Tyr
	65			70					75				80		
Val	Ala	Asp	Pro	Ala	Leu	Val	Glu	Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	Glu	Ser	His
			85					90				95			
Cys	Pro	Glu	Arg	Cys	Ser	Phe	Ser	Ser	Trp	Ser	Glu	His	Arg	Arg	Arg
			100					105				110			
His	Gln	Arg	Ala	Cys	Gly	Leu	Leu	Thr	Ala	Asp	Gly	Glu	Glu	Trp	Gln
			115					120				125			
Arg	Leu	Arg	Ser	Leu	Leu	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu	Arg	Pro	Gln	Ala	Ala
			130				135				140				
Ala	Gly	Tyr	Ala	Gly	Thr	Leu	Asp	Ser	Val	Val	Ser	Asp	Leu	Val	Arg
	145				150				155				160		
Arg	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Gly	Arg	Gly	Ser	Gly	Leu	Pro	Asp	Leu	Val
			165					170				175			
Leu	Asp	Val	Ala	Gly	Glu	Phe	Tyr	Lys	Phe	Gly	Leu	Glu	Gly	Ile	Gly
			180					185				190			
Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Ser	Arg	Leu	Gly	Cys	Leu	Glu	Ala	Glu	Val	Pro


```

      195              200              205
Pro Asp Thr Glu Thr Phe Ile Glu Ala Val Gly Ser Val Phe Val Ser
  210              215              220
Thr Leu Leu Thr Met Ala Met Pro Ser Trp Leu His Arg Leu Ile Pro
  225              230              235              240
Gly Pro Trp Ala Arg Leu Cys Arg Asp Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe
      245              250              255
Ala Gln Lys His Val Glu Gln Arg Glu Gly Glu Ala Ala Val Arg Asn
      260              265              270
Gln Gly Lys Pro Glu Glu Asp Leu Pro Thr Gly His His Leu Thr His
      275              280              285
Phe Leu Phe Arg Glu Lys Val Ser Val Gln Ser Ile Val Gly Asn Val
      290              295              300
Thr Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser
  305              310              315              320
Trp Ala Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His Pro Glu Val Gln Ser Ala Leu
      325              330              335
His Ser Glu Ile Thr Gly Ala Val Asn Pro Gly Ser Tyr Ala His Leu
      340              345              350
Gln Ala Thr Ala Leu Ser Gln Leu Pro Leu Leu Lys Ala Val Ile Lys
      355              360              365
Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro
      370              375              380
Asp Arg Asp Ile Cys Val Gly Asn Tyr Val Ile Pro Gln Asp Thr Leu
  385              390              395              400
Val Ser Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser Arg Asp Pro Ala Gln Phe Arg
      405              410              415
Glu Pro Asn Ser Phe Asn Pro Ala Arg Trp Leu Gly Glu Gly Pro Ala
      420              425              430
Pro His Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys
      435              440              445
Ile Gly Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu Leu Gln Met Ala Leu Ala Gln
      450              455              460
Ile Leu Thr His Phe Glu Val Leu Pro Glu Pro Gly Ala Leu Pro Val
  465              470              475              480
Lys Pro Met Thr Arg Thr Val Leu Val Pro Glu Arg Ser Ile His Leu
      485              490              495
Gln Phe Val Asp Arg
      500

```

【0135】配列番号：2

配列の長さ：508

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：

生物名：ヒト

組織の種類：腎臓

配列：

```

Met Thr Gln Thr Leu Lys Tyr Ala Ser Arg Val Phe His Arg Val Arg
  1              5              10              15
Trp Ala Pro Glu Leu Gly Ala Ser Leu Gly Tyr Arg Glu Tyr His Ser
      20              25              30
Ala Arg Arg Ser Leu Ala Asp Ile Pro Gly Pro Ser Thr Pro Ser Phe
      35              40              45

```

Leu Ala Glu Leu Phe Cys Lys Gly Gly Leu Ser Arg Leu His Glu Leu
 50 55 60
 Gln Val Gln Gly Ala Ala His Phe Gly Pro Val Trp Leu Ala Ser Phe
 65 70 75 80
 Gly Thr Val Arg Thr Val Tyr Val Ala Ala Pro Ala Leu Val Glu Glu
 85 90 95
 Leu Leu Arg Gln Glu Gly Pro Arg Pro Glu Arg Cys Ser Phe Ser Pro
 100 105 110
 Trp Thr Glu His Arg Arg Cys Arg Gln Arg Ala Cys Gly Leu Leu Thr
 115 120 125
 Ala Glu Gly Glu Glu Trp Gln Arg Leu Arg Ser Leu Leu Ala Pro Leu
 130 135 140
 Leu Leu Arg Pro Gln Ala Ala Ala Arg Tyr Ala Gly Thr Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Val Val Cys Asp Leu Val Arg Arg Leu Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gly
 165 170 175
 Thr Gly Pro Pro Ala Leu Val Arg Asp Val Ala Gly Glu Phe Tyr Lys
 180 185 190
 Phe Gly Leu Glu Gly Ile Ala Ala Val Leu Leu Gly Ser Arg Leu Gly
 195 200 205
 Cys Leu Glu Ala Gln Val Pro Pro Asp Thr Glu Thr Phe Ile Arg Ala
 210 215 220
 Val Gly Ser Val Phe Val Ser Thr Leu Leu Thr Met Ala Met Pro His
 225 230 235 240
 Trp Leu Arg His Leu Val Pro Gly Pro Trp Gly Arg Leu Cys Arg Asp
 245 250 255
 Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe Ala Gln Arg His Val Glu Arg Arg Glu
 260 265 270
 Ala Glu Ala Ala Met Arg Asn Gly Gly Gln Pro Glu Lys Asp Leu Glu
 275 280 285
 Ser Gly Ala His Leu Thr His Phe Leu Phe Arg Glu Glu Leu Pro Ala
 290 295 300
 Gln Ser Ile Leu Gly Asn Val Thr Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp
 305 310 315 320
 Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser Trp Ala Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His
 325 330 335
 Pro Glu Val Gln Thr Ala Leu His Ser Glu Ile Thr Ala Ala Leu Ser
 340 345 350
 Pro Gly Ser Ser Ala Tyr Pro Ser Ala Thr Val Leu Ser Gln Leu Pro
 355 360 365
 Leu Leu Lys Ala Val Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val
 370 375 380
 Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro Asp Lys Asp Ile His Val Gly Asp Tyr
 385 390 395 400
 Ile Ile Pro Lys Asn Thr Leu Val Thr Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser
 405 410 415
 Arg Asp Pro Ala Gln Phe Pro Glu Pro Asn Ser Phe Arg Pro Ala Arg
 420 425 430
 Trp Leu Gly Glu Gly Pro Thr Pro His Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe
 435 440 445

Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys Met Gly Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu
 450 455 460
 Leu Gln Met Ala Leu Ala Gln Ile Leu Thr His Phe Glu Val Gln Pro
 465 470 475 480
 Glu Pro Gly Ala Ala Pro Val Arg Pro Lys Thr Arg Thr Val Leu Val
 485 490 495
 Pro Glu Arg Ser Ile Asn Leu Gln Phe Leu Asp Arg
 500 505

【0136】配列番号：3

配列の長さ：1503

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：ラット

組織の種類：腎臓

配列

ATG ACC CAG GCA GTC AAG CTC GCC TCC AGA GTC TTC CAT CGA GTC CAA	48
Met Thr Gln Ala Val Lys Leu Ala Ser Arg Val Phe His Arg Val Gln	
1 5 10 15	
CTG CCT TCT CAG CTG GGC AGT GAC TCG GTT CTC CGG AGT TTA TCT GAT	96
Leu Pro Ser Gln Leu Gly Ser Asp Ser Val Leu Arg Ser Leu Ser Asp	
20 25 30	
ATC CCT GGG CCC TCT ACA CCT AGC TTC CTG GCT GAA CTC TTC TGC AAA	144
Ile Pro Gly Pro Ser Thr Pro Ser Phe Leu Ala Glu Leu Phe Cys Lys	
35 40 45	
GGG GGG CTG TCC AGG CTA CAT GAA CTG CAG GTG CAT GGC GCT GCG CGG	192
Gly Gly Leu Ser Arg Leu His Glu Leu Gln Val His Gly Ala Ala Arg	
50 55 60	
TAC GGG CCA ATA TGG TCC GGC AGC TTC GGG ACA CTT CGC ACA GTT TAT	240
Tyr Gly Pro Ile Trp Ser Gly Ser Phe Gly Thr Leu Arg Thr Val Tyr	
65 70 75 80	
GTG GCC GAC CCT GCA CTT GTA GAG CAG CTC CTG CGA CAA GAA AGT CAT	288
Val Ala Asp Pro Ala Leu Val Glu Gln Leu Leu Arg Gln Glu Ser His	
85 90 95	
TGT CCA GAG CGC TGT AGT TTC TCA TCT TGG TCA GAG CAC CGT CGC CGC	336
Cys Pro Glu Arg Cys Ser Phe Ser Ser Trp Ser Glu His Arg Arg Arg	
100 105 110	
CAC CAG CGG GCT TGC GGG TTG CTA ACG CGG GAT GGT GAA GAA TGG CAG	384
His Gln Arg Ala Cys Gly Leu Leu Thr Ala Asp Gly Glu Glu Trp Gln	
115 120 125	
AGG CTC CGA AGT CTC CTG GCC CCG CTA CTC CTC CGA CCT CAA GCA GCC	432
Arg Leu Arg Ser Leu Leu Ala Pro Leu Leu Leu Arg Pro Gln Ala Ala	
130 135 140	
GCC GGC TAT GCT GGA ACT CTG GAC AGC GTG GTC AGT GAC CTC GTG CGA	480
Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Asp Ser Val Val Ser Asp Leu Val Arg	
145 150 155 160	
CGA CTA AGG CGC CAG CGG GGA CGT GGC TCT GGG CTA CCG GAC CTA GTT	528
Arg Leu Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gly Ser Gly Leu Pro Asp Leu Val	
165 170 175	
CTG GAC GTG GCG GGA GAG TTT TAC AAA TTT GGC CTA GAA GGC ATA GGC	576
Leu Asp Val Ala Gly Glu Phe Tyr Lys Phe Gly Leu Glu Gly Ile Gly	
180 185 190	

GCG GTG CTG CTG GGA TCG CGC CTG GGC TGC CTG GAG GCT GAA GTT CCT Ala Val Leu Leu Gly Ser Arg Leu Gly Cys Leu Glu Ala Glu Val Pro 195 200 205	624
CCC GAC ACA GAA ACC TTC ATT GAG GCC GTG GGC TCG GTG TTT GTG TCT Pro Asp Thr Glu Thr Phe Ile Glu Ala Val Gly Ser Val Phe Val Ser 210 215 220	672
ACA CTC TTG ACC ATG GCA ATG CCC ACT TGG CTG CAC CGC CTT ATA CCC Thr Leu Leu Thr Met Ala Met Pro Ser Trp Leu His Arg Leu Ile Pro 225 230 235 240	720
GGA CCC TGG GCC CGC CTC TGC AGA GAC TGG GAT CAG ATG TTT GCC TTT Gly Pro Trp Ala Arg Leu Cys Arg Asp Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe 245 250 255	768
GCC CAG AAG CAC GTG GAG CAG CGC GAA GGC GAA GCT GCC GTG AGG AAC Ala Gln Lys His Val Glu Gln Arg Glu Gly Glu Ala Ala Val Arg Asn 260 265 270	816
CAG GGA AAG CCT GAG GAG GAT TTG CCA ACG GGG CAT CAC TTA ACC CAC Gln Gly Lys Pro Glu Glu Asp Leu Pro Thr Gly His His Leu Thr His 275 280 285	864
TTC CTT TTT CGG GAA AAG GTG TCT GTC CAG TCC ATA GTG GGA AAT GTG Phe Leu Phe Arg Glu Lys Val Ser Val Gln Ser Ile Val Gly Asn Val 290 295 300	912
ACA GAG CTA CTA CTG GCT GGA GTG GAC ACG GTA TCC AAT ACG CTC TCC Thr Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser 305 310 315 320	960
TGG GCA CTC TAT CAG CTC TCC CGG CAC CCG GAA GTC CAG TCT GCA CTC Trp Ala Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His Pro Glu Val Gln Ser Ala Leu 325 330 335	1008
CAC TCT GAG ATC ACA GGC GCT GTG AAC CCT GGC TCC TAT GCC CAC CTC His Ser Glu Ile Thr Gly Ala Val Asn Pro Gly Ser Tyr Ala His Leu 340 345 350	1056
CAA GCC ACT GCT CTG TCC CAG CTA CCC CTG CTA AAG GCT GTG ATC AAA Gln Ala Thr Ala Leu Ser Gln Leu Pro Leu Leu Lys Ala Val Ile Lys 355 360 365	1104
GAA GTG TTG AGA TTG TAC CCT GTG GTA CCT GGC AAC TCC CGT GTG CCA Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro 370 375 380	1152
GAC AGA GAC ATC TGT GTA GGA AAC TAT GTT ATT CCC CAA GAT ACA CTG Asp Arg Asp Ile Cys Val Gly Asn Tyr Val Ile Pro Gln Asp Thr Leu 385 390 395 400	1200
GTT TCC CTC TGT CAC TAT GCC ACT TCA AGG GAC CCC GCC CAG TTT CGG Val Ser Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser Arg Asp Pro Ala Gln Phe Arg 405 410 415	1248
GAA CCC AAC TCT TTT AAT CCA GCT CGA TGG CTT GCA GAG GGT CCA GCC Glu Pro Asn Ser Phe Asn Pro Ala Arg Trp Leu Gly Glu Gly Pro Ala 420 425 430	1296
CCC CAC CCA TTT GCA TCT CTT CCT TTT GGC TTT GGC AAA CGA AGT TGC Pro His Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys 435 440 445	1344
ATA GGC AGA CGC TTG GCA GAG CTC GAC CTA CAA ATG GCG TTG GCC CAG Ile Gly Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu Leu Gln Met Ala Leu Ala Gln	1392

450	455	460	
ATC TTG ACC CAT TTT GAG GTG CTG CCT GAG CCA GGT GCT CTT CCA GTC	1440		
Ile Leu Thr His Phe Glu Val Leu Pro Glu Pro Gly Ala Leu Pro Val			
465	470	475	480
AAA CCC ATG ACC CGG ACT GTC CTG GTA CCT GAG AGG AGC ATC CAT CTC	1488		
Lys Pro Met Thr Arg Thr Val Leu Val Pro Glu Arg Ser Ile His Leu			
485	490	495	
CAG TTT GTA GAC AGA	1503		
Gln Phe Val Asp Arg			
500			

【0137】配列番号：4

配列の長さ：2469

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：ヒト

組織の種類：腎臓

配列

ATG ACC CAG ACC CTC AAG TAC GCC TCC AGA GTG TTC CAT CGC GTC CGC	48
Met Thr Gln Thr Leu Lys Tyr Ala Ser Arg Val Phe His Arg Val Arg	
1 5 10 15	
TGG GCG CCC GAG TTG GGC GCC TCC CTA GGC TAC CGA GAG TAC CAC TCA	96
Trp Ala Pro Glu Leu Gly Ala Ser Leu Gly Tyr Arg Glu Tyr His Ser	
20 25 30	
GCA CGC CGG AGC TTG GCA GAC ATC CCA GGC CCC TCT ACG CCC AGC TTT	144
Ala Arg Arg Ser Leu Ala Asp Ile Pro Gly Pro Ser Thr Pro Ser Phe	
35 40 45	
CTG GCC GAA CTT TTC TGC AAG GGG GGC CTG TCG AGG CTA CAC GAG CTG	192
Leu Ala Glu Leu Phe Cys Lys Gly Gly Leu Ser Arg Leu His Glu Leu	
50 55 60	
CAG GTG CAG GGC GCC GCG CAC TTC GGG CCG GTG TGG CTA GCC AGC TTT	240
Gln Val Gln Gly Ala Ala His Phe Gly Pro Val Trp Leu Ala Ser Phe	
65 70 75 80	
GGG ACA GTG CGC ACC GTG TAC GTG GCT GCC CCT GCA CTC GTC GAG GAG	288
Gly Thr Val Arg Thr Val Tyr Val Ala Ala Pro Ala Leu Val Glu Glu	
85 90 95	
CTG CTG CGA CAG GAG GGA CCC CGG CCC GAG CGC TGC AGC TTC TCG CCC	336
Leu Leu Arg Gln Glu Gly Pro Arg Pro Glu Arg Cys Ser Phe Ser Pro	
100 105 110	
TGG ACC GAG CAC CGC CGC TGC CGC CAG CGG GCT TGC GGA CTG CTC ACT	384
Trp Thr Glu His Arg Arg Cys Arg Gln Arg Ala Cys Gly Leu Leu Thr	
115 120 125	
CCG GAA GGC GAA GAA TGG CAA AGG CTC CGC ACT CTC CTG GCC CCG CTC	432
Ala Glu Gly Glu Glu Trp Gln Arg Leu Arg Ser Leu Leu Ala Pro Leu	
130 135 140	
CTC CTC CGG CCT CAA GCG GCC GCC CGC TAC GCC GGA ACC CTG AAC AAC	480
Leu Leu Arg Pro Gln Ala Ala Ala Arg Tyr Ala Gly Thr Leu Asn Asn	
145 150 155 160	
GTA GTC TGC GAC CTT GTG CCG CGT CTG ACG CGC CAG CGG GGA CGT GGC	528
Val Val Cys Asp Leu Val Arg Arg Leu Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gly	
165 170 175	
ACG GGG CCG CCC GCC CTG GTT CGG GAC GTG GCG GGG GAA TTT TAC AAG	576

Thr Gly Pro Pro Ala Leu Val Arg Asp Val Ala Gly Glu Phe Tyr Lys	
180 185 190	
TTC GGA CTG GAA GGC ATC GCC GCG GTT CTG CTC GGC TCG CGC TTG GGC	624
Phe Gly Leu Glu Gly Ile Ala Ala Val Leu Leu Gly Ser Arg Leu Gly	
195 200 205	
TGC CTG GAG GCT CAA GTG CCA CCC GAC ACG GAG ACC TTC ATC CGC GCT	672
Cys Leu Glu Ala Gln Val Pro Pro Asp Thr Glu Thr Phe Ile Arg Ala	
210 215 220	
GTG GGC TCG GTG TTT GTG TCC ACG CTG TTG ACC ATG GCG ATG CCC CAC	720
Val Gly Ser Val Phe Val Ser Thr Leu Leu Thr Met Ala Met Pro His	
225 230 235 240	
TGC CTG CGC CAC CTT GTG CCT GCG CCC TGG GCG CGC CTC TGC CGA GAC	768
Trp Leu Arg His Leu Val Pro Gly Pro Trp Gly Arg Leu Cys Arg Asp	
245 250 255	
TGG GAC CAG ATG TTT GCA TTT GCT CAG AGG CAC GTG GAG CGG CGA GAG	816
Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe Ala Gln Arg His Val Glu Arg Arg Glu	
260 265 270	
GCA GAG GCA GCC ATG AGG AAC GGA GGA CAG CCC GAG AAG GAC CTG GAG	864
Ala Glu Ala Ala Met Arg Asn Gly Gly Gln Pro Glu Lys Asp Leu Glu	
275 280 285	
TCT GGG GCG CAC CTG ACC CAC TTC CTG TTC CGG GAA GAG TTG CCT GCC	912
Ser Gly Ala His Leu Thr His Phe Leu Phe Arg Glu Glu Leu Pro Ala	
290 295 300	
CAG TCC ATC CTG GGA AAT GTG ACA GAG TTG CTA TTG GCG GGA GTG GAC	960
Gln Ser Ile Leu Gly Asn Val Thr Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp	
305 310 315 320	
ACG GTG TCC AAC ACG CTC TCT TGG GCT CTG TAT GAG CTC TCC CGG CAC	1008
Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser Trp Ala Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His	
325 330 335	
CCC GAA GTC CAG ACA GCA CTC CAC TCA GAG ATC ACA GCT GCC CTG AGC	1056
Pro Glu Val Gln Thr Ala Leu His Ser Glu Ile Thr Ala Ala Leu Ser	
340 345 350	
CCT GGC TCC AGT GCC TAC CCC TCA GCC ACT GTT CTG TCC CAG CTG CCC	1104
Pro Gly Ser Ser Ala Tyr Pro Ser Ala Thr Val Leu Ser Gln Leu Pro	
355 360 365	
CTG CTG AAG GCG GTG GTC AAG GAA GTG CTA AGA CTG TAC CCT GTG GTA	1152
Leu Leu Lys Ala Val Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val	
370 375 380	
CCT GGA AAT TCT CGT GTC CCA GAC AAA GAC ATT CAT GTG GGT GAC TAT	1200
Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro Asp Lys Asp Ile His Val Gly Asp Tyr	
385 390 395 400	
ATT ATC CCC AAA AAT ACG CTG GTC ACT CTG TGT CAC TAT GCC ACT TCA	1248
Ile Ile Pro Lys Asn Thr Leu Val Thr Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser	
405 410 415	
AGG GAC CCT GCC CAG TTC CCA GAG CCA AAT TCT TTT CGT CCA GCT CGC	1296
Arg Asp Pro Ala Gln Phe Pro Glu Pro Asn Ser Phe Arg Pro Ala Arg	
420 425 430	
TGG CTG GCG GAG GGT CCC ACC CCC CAC CCA TTT GCA TCT CTT CCC TTT	1344
Trp Leu Gly Glu Gly Pro Thr Pro His Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe	
435 440 445	

```

GGC TTT GGC AAG CGC AGC TGT ATG GGC AGA CGC CTG GCA GAG CTT GAA 1392
Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys Met Gly Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu
    450          455          460
TTG CAA ATG GCT TTG GCC CAG ATC CTA ACA CAT TTT CAG GTG CAG CCT 1440
Leu Gln Met Ala Leu Ala Gln Ile Leu Thr His Phe Glu Val Gln Pro
    465          470          475          480
GAG CCA GGT GCG GCC CCA GTT AGA CCC AAG ACC CGG ACT CTC CTG GTA 1488
Glu Pro Gly Ala Ala Pro Val Arg Pro Lys Thr Arg Thr Val Leu Val
    485          490          495
CCT GAA AGG AGC ATC AAC CTA CAG TTT TTG GAC AGA 1524
Pro Glu Arg Ser Ile Asn Leu Gln Phe Leu Asp Arg
    500          505

```

【0138】配列番号：5

配列の長さ：2469

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：ラット

組織の種類：腎臓

配列

```

GAGCAGACTC CTCAAACACA AAC ATG ACC CAG GCA GTC AAG CTC GCC TCC AGA 53
Met Thr Gln Ala Val Lys Leu Ala Ser Arg
    1          5          10
GTC TTC CAT CGA GTC CAA CTG CCT TCT CAG CTG GGC AGT GAC TCG GTT 101
Val Phe His Arg Val Gln Leu Pro Ser Gln Leu Gly Ser Asp Ser Val
    15          20          25
CTC CGG AGT TTA TCT GAT ATC CCT GGG CCC TCT ACA CCT AGC TTC CTG 149
Leu Arg Ser Leu Ser Asp Ile Pro Gly Pro Ser Thr Pro Ser Phe Leu
    30          35          40
GCT GAA CTC TTC TGC AAA GGG GGG CTG TCC AGG CTA CAT GAA CTG CAG 197
Ala Glu Leu Phe Cys Lys Gly Gly Leu Ser Arg Leu His Glu Leu Gln
    45          50          55
CTG CAT GGC GCT GCG CGG TAC GGG CCA ATA TGG TCC GGC AGC TTC GGG 245
Val His Gly Ala Ala Arg Tyr Gly Pro Ile Trp Ser Gly Ser Phe Gly
    60          65          70
ACA CTT CGC ACA GTT TAT GTG GCC GAC CCT GCA CTT GTA GAG CAG CTC 293
Thr Leu Arg Thr Val Tyr Val Ala Asp Pro Ala Leu Val Glu Gln Leu
    75          80          85          90
CTG CGA CAA GAA AGT CAT TGT CCA GAG CGC TGT AGT TTC TCA TCT TGG 341
Leu Arg Gln Glu Ser His Cys Pro Glu Arg Cys Ser Phe Ser Ser Trp
    95          100          105
TCA GAG CAC CGT CGC CGC CAC CAG CGG GCT TGC GGG TTG CTA ACG GCG 389
Ser Glu His Arg Arg Arg His Gln Arg Ala Cys Gly Leu Leu Thr Ala
    110          115          120
GAT GGT GAA GAA TGG CAG AGG CTC CGA AGT CTC CTG GCC CCG CTA CTC 437
Asp Gly Glu Glu Trp Gln Arg Leu Arg Ser Leu Leu Ala Pro Leu Leu
    125          130          135
CTC CGA CCT CAA GCA GCC GCC GGC TAT GCT GGA ACT CTG GAC AGC GTG 485
Leu Arg Pro Gln Ala Ala Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Asp Ser Val
    140          145          150
CTC AGT GAC CTC GTG CGA CGA CTA AGG CGC CAG CGG GCA CGT GGC TCT 533
Val Ser Asp Leu Val Arg Arg Leu Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gly Ser

```

155	160	165	170	
GGG CTA CCG GAC CTA GTT CTG GAC GTG GCG GGA GAG TTT TAC AAA TTT				581
Gly Leu Pro Asp Leu Val Leu Asp Val Ala Gly Glu Phe Tyr Lys Phe				
	175	180	185	
GGC CTA GAA GGC ATA GGC GCG GTG CTG CTG GGA TCG CGC CTG GGC TGC				629
Gly Leu Glu Gly Ile Gly Ala Val Leu Leu Gly Ser Arg Leu Gly Cys				
	190	195	200	
CTG GAG GCT GAA GTT CCT CCC GAC ACA GAA ACC TTC ATT GAG GCC GTG				677
Leu Glu Ala Glu Val Pro Pro Asp Thr Glu Thr Phe Ile Glu Ala Val				
	205	210	215	
GGC TCG GTG TTT GTG TCT ACA CTC TTG ACC ATG GCA ATG CCC AGT TGG				725
Gly Ser Val Phe Val Ser Thr Leu Leu Thr Met Ala Met Pro Ser Trp				
	220	225	230	
CTG CAC CGC CTT ATA CCC GGA CCC TGG GCC CGC CTC TGC AGA GAC TGG				773
Leu His Arg Leu Ile Pro Gly Pro Trp Ala Arg Leu Cys Arg Asp Trp				
	235	240	245	250
GAT CAG ATG TTT GCC TTT GCC CAG AAG CAC GTG GAG CAG CGC GAA GCC				821
Asp Gln Met Phe Ala Phe Ala Gln Lys His Val Glu Gln Arg Glu Gly				
	255	260	265	
GAA GCT GCC GTG AGG AAC CAG GGA AAG CCT GAG GAG GAT TTG CCA ACC				869
Glu Ala Ala Val Arg Asn Gln Gly Lys Pro Glu Glu Asp Leu Pro Thr				
	270	275	280	
GGG CAT CAC TTA ACC CAC TTC CTT TTT CGG GAA AAG GTG TCT GTC CAG				917
Gly His His Leu Thr His Phe Leu Phe Arg Glu Lys Val Ser Val Gln				
	285	290	295	
TCC ATA GTG GGA AAT GTG ACA GAG CTA CTA CTG GCT GGA GTG GAC ACG				965
Ser Ile Val Gly Asn Val Thr Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp Thr				
	300	305	310	
GTA TCC AAT ACG CTC TCC TGG GCA CTC TAT GAG CTC TCC CGG CAC CCG				1013
Val Ser Asn Thr Leu Ser Trp Ala Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His Pro				
	315	320	325	330
GAA GTC CAG TCT GCA CTC CAC TCT GAG ATC ACA GGC GCT GTG AAC CCT				1061
Glu Val Gln Ser Ala Leu His Ser Glu Ile Thr Gly Ala Val Asn Pro				
	335	340	345	
GGC TCC TAT GCC CAC CTC CAA GCC ACT GCT CTG TCC CAG CTA CCC CTG				1109
Gly Ser Tyr Ala His Leu Gln Ala Thr Ala Leu Ser Gln Leu Pro Leu				
	350	355	360	
CTA AAG GCT GTG ATC AAA GAA GTG TTG AGA TTG TAC CCT GTG GTA CCT				1157
Leu Lys Ala Val Ile Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val Pro				
	365	370	375	
GGG AAC TCC CGT GTC CCA GAC AGA GAC ATC TGT GTA GGA AAC TAT GTT				1205
Gly Asn Ser Arg Val Pro Asp Arg Asp Ile Cys Val Gly Asn Tyr Val				
	380	385	390	
ATT CCC CAA GAT ACA CTG GTT TCC CTC TGT CAC TAT GCC ACT TCA AGG				1253
Ile Pro Gln Asp Thr Leu Val Ser Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser Arg				
	395	400	405	410
GAC CCC GCC CAG TTT CGG GAA CCC AAC TCT TTT AAT CCA GCT CGA TGG				1301
Asp Pro Ala Gln Phe Arg Glu Pro Asn Ser Phe Asn Pro Ala Arg Trp				
	415	420	425	
CTT GGA GAG GGT CCA GCC CCC CAC CCA TTT GCA TCT CTT CCT TTT GGC				1349


```

Leu Gly Glu Gly Pro Ala Pro His Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe Gly
      430                      435                      440
TTT GGC AAA CGA AGT TGC ATA GGG AGA CGC TTG GCA GAG CTC GAG CTA 1397
Phe Gly Lys Arg Ser Cys Ile Gly Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu Leu
      445                      450                      455
CAA ATG GCG TTG GCC CAG ATC TTG ACC CAT TTT GAG GTC CTC CCT GAG 1445
Gln Met Ala Leu Ala Gln Ile Leu Thr His Phe Glu Val Leu Pro Glu
      460                      465                      470
CCA GGT GCT CTT CCA GTC AAA CCC ATG ACC CGG ACT GTC CTG GTA CCT 1493
Pro Gly Ala Leu Pro Val Lys Pro Met Thr Arg Thr Val Leu Val Pro
      475                      480                      485                      490
GAG AGG AGC ATC CAT CTC CAG TTT GTA GAC AGA TAGTCCTGTG GAAGGCAGCT 1546
Glu Arg Ser Ile His Leu Gln Phe Val Asp Arg
      495                      500
GTCATCATCT CTCTCCAGAC TGGATTTTTC TTACTATGCA CAAGAGGCAC ACTCTCCCTC 1606
GAGGCCTGTC TGTCTGAGCA AACTTCAGGA AGCAGGCCCG GGCCTATCTG TGCTTGACCT 1666
GACTCAGCAG GTACCACAGA ACCAGGATCC TTTCTCCTGC TCAGTACCTC TCCTGATCAT 1726
TCCTCAAGAT CCAAAGCCTT CAGATTTTAA CACATCCTTA AAGGCCCAAC TCGGGGGTTA 1786
ACTAACAGCC CCAGGCAGCC TGGGCAGGA TCCCCACTG ATCCTTCCAT GCTTACAGTG 1846
TTCACGTACA GCTGTCTAAG CATCCATTGC AGCACAAACT AAGTACTGT GCACCTGGTC 1906
TGCACCTGGT CTGCACCTGG TTGCGTCTCT GCCTGACCAT GTGAGCTCTT TGACAAGACT 1966
GATGACTACT GGGCTTTTAC CTCTTTTCCT TTTTGGGACA CAGTCTTGCT ATTGTACTCC 2026
ATGCTGTGCT TGAACCCACA AGCCCTCACC TCACCTTCCC AAGTGTGGG TTACGGACAT 2086
TAGCTATGGC TTCCAGCTTT ATTAGTCTTT CTATCTCCTG CCATGGTCTA TCCCCGGCTA 2146
TTTGATACTA TATATTCTCA GATTGAATCT GGACCATGTG GTAGAAGGA TGACCACTCA 2206
CCAGGCTCTA CCCACCACTT TATCTTAATC TTTTCTCTAG GAAAGTGAAT CTCTCCTTGC 2266
CTTACAGCAT TTAAAGCTC CCCTTGGCTG TTCTGCTCTT TAGCCACTCT AAAGTGGATC 2326
CACTCTACTT CTCACCACCC ATCTTTCTGC ACCCCAGCCT GTCTTTTAT ATTTAAAAAA 2386
TTGTATTAT TATGTTTCA AATAAAATGT TTACTCCTTG AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2446
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA 2469

```

【0.139】配列番号：6

配列の長さ：2469

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：ヒト

組織の種類：腎臓

配列

```

AGGAGGGATT GCCTGAGGAG CTGCGAGAGG GGGCGTCATC ACCTCACCCA AAGGTTAAAT 60
AGGGGTTGAG ATATGATGCT CAGGAGAAGC GCTTTCTTTC GCGAGACCC TGAACCAGAC 120
C ATG ACC CAG ACC CTC AAG TAC GCC TCC AGA GTG TTC CAT CGC GTC CGC 169
Met Thr Gln Thr Leu Lys Tyr Ala Ser Arg Val Phe His Arg Val Arg
      1                      5                      10                      15
TGG GCG CCC GAG TTG GGC GCC TCC CTA GGC TAC CGA GAG TAC CAC TCA 217
Trp Ala Pro Glu Leu Gly Ala Ser Leu Gly Tyr Arg Glu Tyr His Ser
      20                      25                      30
GCA CGC CGG AGC TTG GCA GAC ATC CCA GGC CCC TCT ACG CCC AGC TTT 265
Ala Arg Arg Ser Leu Ala Asp Ile Pro Gly Pro Ser Thr Pro Ser Phe
      35                      40                      45
CTG GCC GAA CTT TTC TGC AAG GCG GCG CTG TCG AGG CTA CAC GAG CTG 313
Leu Ala Glu Leu Phe Cys Lys Gly Gly Leu Ser Arg Leu His Glu Leu
      50                      55                      60

```

CAG GTG CAG GGC GCC GCG CAC TTC GGG CCG CTG TGG CTA GCC AGC TTT	361
Gln Val Gln Gly Ala Ala His Phe Gly Pro Val Trp Leu Ala Ser Phe	
65 70 75 80	
GGG ACA GTG CGC ACC GTG TAC GTG GCT GCC CCT GCA CTC GTC GAG GAG	409
Gly Thr Val Arg Thr Val Tyr Val Ala Ala Pro Ala Leu Val Glu Glu	
85 90 95	
CTG CTG CGA CAG CAG GGA CCC CGG CCC GAG CGC TGC AGC TTC TCG CCC	457
Leu Leu Arg Gln Glu Gly Pro Arg Pro Glu Arg Cys Ser Phe Ser Pro	
100 105 110	
TGG ACG GAG CAC CGC CGC TGC CGC CAG CGG GCT TGC GGA CTG CTC ACT	505
Trp Thr Glu His Arg Arg Cys Arg Gln Arg Ala Cys Gly Leu Leu Thr	
115 120 125	
CGC GAA GGC GAA GAA TGG CAA AGG CTC CGC ACT CTC CTG GCC CCG CTC	553
Ala Glu Gly Glu Glu Trp Gln Arg Leu Arg Ser Leu Leu Ala Pro Leu	
130 135 140	
CTC CTC CGG CCT CAA GCG GCC GCC CGC TAC GCC GGA ACC CTG AAC AAC	601
Leu Leu Arg Pro Gln Ala Ala Ala Arg Tyr Ala Gly Thr Leu Asn Asn	
145 150 155 160	
GTA GTC TGC GAC CTT GTG CGG CGT CTG AGG CGC CAG CGG GGA CGT GGC	649
Val Val Cys Asp Leu Val Arg Arg Leu Arg Arg Gln Arg Gly Arg Gly	
165 170 175	
ACG GGG CCG CCC GCC CTG GTT CGG GAC GTG GCG GGG GAA TTT TAC AAG	697
Thr Gly Pro Pro Ala Leu Val Arg Asp Val Ala Gly Glu Phe Tyr Lys	
180 185 190	
TTC GGA CTG GAA GGC ATC GCC GCG GTT CTG CTC GGC TCG CGC TTG GGC	745
Phe Gly Leu Glu Gly Ile Ala Ala Val Leu Leu Gly Ser Arg Leu Gly	
195 200 205	
TGC CTG GAG GCT CAA GTG CCA CCC GAC ACG GAG ACC TTC ATC CGC GCT	793
Cys Leu Glu Ala Gln Val Pro Pro Asp Thr Glu Thr Phe Ile Arg Ala	
210 215 220	
GTG GCG TCG GTG TTT GTG TCC ACG CTG TTG ACC ATG GCG ATG CCC CAC	841
Val Gly Ser Val Phe Val Ser Thr Leu Leu Thr Met Ala Met Pro His	
225 230 235 240	
TGG CTG CGC CAC CTT GTG CCT GGG CCC TGG GGC CGC CTC TGC CGA GAC	889
Trp Leu Arg His Leu Val Pro Gly Pro Trp Gly Arg Leu Cys Arg Asp	
245 250 255	
TGG GAC CAG ATG TTT GCA TTT GCT CAG AGG CAC GTG GAG CGG CGA GAG	937
Trp Asp Gln Met Phe Ala Phe Ala Gln Arg His Val Glu Arg Arg Glu	
260 265 270	
GCA GAG GCA GCC ATG AGC AAC GGA GGA CAG CCC GAG AAG GAC CTG GAG	985
Ala Glu Ala Ala Met Arg Asn Gly Gly Gln Pro Glu Lys Asp Leu Glu	
275 280 285	
TCT GGG CCG CAC CTG ACC CAC TTC CTG TTC CGG GAA GAG TTG CCT GCC	1033
Ser Gly Ala His Leu Thr His Phe Leu Phe Arg Glu Glu Leu Pro Ala	
290 295 300	
CAG TCC ATC CTG GGA AAT GTG ACA GAG TTG CTA TTG GCG GGA GTG GAC	1081
Gln Ser Ile Leu Gly Asn Val Thr Glu Leu Leu Leu Ala Gly Val Asp	
305 310 315 320	
ACG GTG TCC AAC ACG CTC TCT TGG GCT CTG TAT GAG CTC TCC CGG CAC	1129
Thr Val Ser Asn Thr Leu Ser Trp Ala Leu Tyr Glu Leu Ser Arg His	

325	330	335	
CCC GAA GTC CAG ACA GCA CTC CAC TCA GAG ATC ACA GCT GCC CTG AGC			1177
Pro Glu Val Gln Thr Ala Leu His Ser Glu Ile Thr Ala Ala Leu Ser			
340	345	350	
CCT GGC TCC AGT GCC TAC CCC TCA GCC ACT GTT CTG TCC CAG CTG CCC			1225
Pro Gly Ser Ser Ala Tyr Pro Ser Ala Thr Val Leu Ser Gln Leu Pro			
355	360	365	
CTG CTG AAG GCG GTG GTC AAG GAA GTG CTA AGA CTG TAC CCT GTG GTA			1273
Leu Leu Lys Ala Val Val Lys Glu Val Leu Arg Leu Tyr Pro Val Val			
370	375	380	
CCT GGA AAT TCT CGT GTC CCA GAC AAA GAC ATT CAT GTG GGT GAC TAT			1321
Pro Gly Asn Ser Arg Val Pro Asp Lys Asp Ile His Val Gly Asp Tyr			
385	390	395	400
ATT ATC CCC AAA AAT ACG CTG GTC ACT CTG TGT CAC TAT GCC ACT TCA			1369
Ile Ile Pro Lys Asn Thr Leu Val Thr Leu Cys His Tyr Ala Thr Ser			
405	410	415	
AGG GAC CCT GCC CAG TTC CCA GAG CCA AAT TCT TTT CGT CCA GCT CGC			1417
Arg Asp Pro Ala Gln Phe Pro Glu Pro Asn Ser Phe Arg Pro Ala Arg			
420	425	430	
TGG CTG GGG GAG GGT CCC ACC CCC CAC CCA TTT GCA TCT CTT CCC TTT			1465
Trp Leu Gly Glu Gly Pro Thr Pro His Pro Phe Ala Ser Leu Pro Phe			
435	440	445	
GGC TTT GGC AAG CGC AGC TGT ATG GGG AGA CGC CTG GCA GAG CTT GAA			1513
Gly Phe Gly Lys Arg Ser Cys Met Gly Arg Arg Leu Ala Glu Leu Glu			
450	455	460	
TTG CAA ATG GCT TTG GCC CAG ATC CTA ACA CAT TTT GAG GTG CAG CCT			1561
Leu Gln Met Ala Leu Ala Gln Ile Leu Thr His Phe Glu Val Gln Pro			
465	470	475	480
GAG CCA GGT GCG GCC CCA GTT AGA CCC AAG ACC CGG ACT GTC CTG GTA			1609
Glu Pro Gly Ala Ala Pro Val Arg Pro Lys Thr Arg Thr Val Leu Val			
485	490	495	
CCT GAA AGG AGC ATC AAC CTA CAG TTT TTG GAC AGA TAGTCCCATG GAAAGAG			1662
Pro Glu Arg Ser Ile Asn Leu Gln Phe Leu Asp Arg			
500	505		
ACTGTCATCA TCACCCTTTC ATTCAATCATA GGGATAAGAT TTTTGTAGG CACAAGACCA			1722
AGGTATACAT CTTCCCTTAA TGCCTATCTG ACCAACTGG ATAGAACCAC CATAGTGAAG			1782
TGTGAGGCGG CCCTGACCAA TGTGTGAAGT ATGCACTTGG CCTGACTCAG GAAGCCAGGT			1842
GAGAAAACCA TGGTCTCTCT GCTTGCTTGG CCCTTCTGAT CATGTATGCA TCCCCAAGG			1902
ATGAAATCAG ATTTTAACTA ATAATGCTGG ATGCCCTGAG GAAAGATTCA ACTGCCTCTC			1962
TTTTTGGGCT TTCATAGTGT TCATTGATGC TGCTGGCTAA GCATTTATCA AAGCATAAGC			2022
TCAGTAACTG TGCATCTGGT CTGTACCTGG TTGGTCCTTC GTCTTTGCAT GTAAGCTCTT			2082
TGAGAGGAAG GGTGAAGCCT TATTTGTTTT TTATGTCCCC TGCCAGGGCC TGTCTCTGAC			2142
TAGGTGTCAC CATAACATT CTTAGATTGA ATCTGAACCA TGTGCCAGAA GGGATAAGCA			2202
GCTTACTTAG TAGGCTCTGT CTACCCCTTT CCTTCTTTGT CTTGCCCTTA GGAAGGTGAA			2262
TCTGCCCTAG CCTGGTTTAC GGTTCCTTAT AACTCTCCTT TGCTCTCTGG CCACTATTAA			2322
GTGGGTTTTG CCCATCACTT AGTTCTCAGG CAGAGACATC TTTGGGCTG TCCCTGCCCA			2382
GGCCTCTGGC TTTTATATT GAAATTTTT AAATATTCAC AAATTTAGA ATAAATCAAA			2442
TATTCCATTA AAAAAAAAAA AAAAAA			2469

【0140】配列番号：7

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CTSCTSAARG CHGTSATYAA RGA

23

【0141】配列番号：8

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CKCTTBCCRA ABCCRAARGG VA

22

【0142】配列番号：9

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

AAGGCAGTGA TTAAGGAAGT GTTGA

25

【図面の簡単な説明】

【図1】 p c M D 3 R を導入した細胞または p c D N A 3 を導入した細胞によるビタミンD₃代謝物の同定を H P L C を用いて行った結果を示した図である。

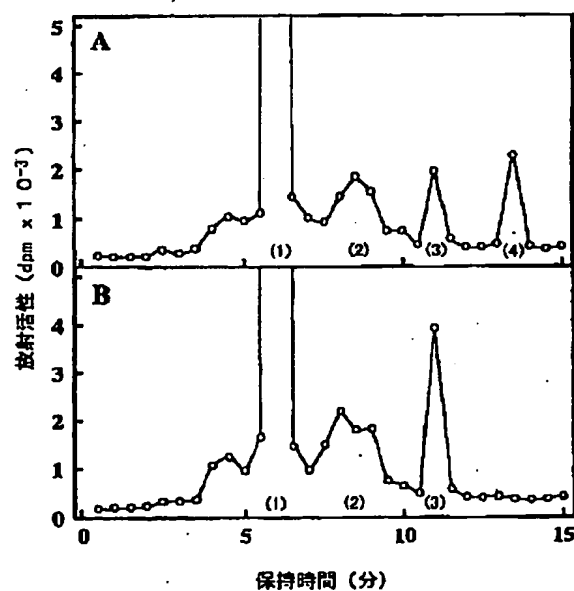
【符号の説明】

A : p c M D 3 R を導入した細胞によるビタミンD₃代謝物の同定結果

B : p c D N A 3 を導入した細胞によるビタミンD₃代謝物の同定結果

(1) : 25-ヒドロキシビタミンD₃(2) : 24, 25-ジヒドロキシビタミンD₃(3) : 10-oxo-19-nor-25-ヒドロキシビタミンD₃(4) : α, 25-ジヒドロキシビタミンD₃

【図1】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

G 0 1 N 33/48

33/50

33/53

// (C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)

識別記号

F I

G 0 1 N 33/50

33/53

C 1 2 N 5/00

P

D

B

(C 1 2 N 9/02
C 1 2 R 1:91)
(C 1 2 P 33/06
C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 猿田 享男
東京都大田区上池台 3 - 28 - 2
(72)発明者 石村 ▲巽▼
東京都三鷹市下連雀 7 - 7 - 14
(72)発明者 林 松彦
東京都渋谷区神宮前 4 - 15 - 9

(72)発明者 脇野 修
東京都練馬区石神井台 7 - 12 - 14
(72)発明者 門川 俊明
東京都中野区中野 1 - 21 - 10
(72)発明者 吉田 理
東京都目黒区緑ヶ丘 3 - 10 - 24
(72)発明者 鈴木 洋通
東京都板橋区中丸町 36 - 10